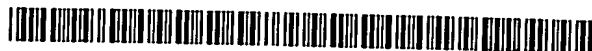


(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. November 2004 (25.11.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/100928 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 9/127**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2004/000998**

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Mai 2004 (08.05.2004)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
103 21 263.9 9. Mai 2003 (09.05.2003) DE
10 2004 005 783.4 4. Februar 2004 (04.02.2004) DE
10 2004 005 784.2 4. Februar 2004 (04.02.2004) DE
10 2004 010 720.3 4. März 2004 (04.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120
Halle (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PANZNER, Steffen
[DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE). LUTZ,
Silke [DE/DE]; Schleiermacherstrasse 34, 06114 Halle
(DE).**

(74) Anwälte: **LANGE, Sven** usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig
& Schneider, Wallstr. 58/59, 10179 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **INJECTABLE LIPOSOMAL DEPOTS FOR DELIVERING ACTIVE INGREDIENTS**

(54) Bezeichnung: **INJIZIERBARE LIPOSOMALE DEPOTS ZUM WIRKSTOFFDELIVERY**

(57) Abstract: The invention relates to liposomal formulations for producing an injectable depot of extended release peptide, protein and oligonucleotide active substances with a long-term action in a mammalian body.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft liposomale Formulierungen zur Herstellung eines injizierbaren Depots von Peptid-, Protein und Oligonukleotidwirkstoffen zur langanhaltenden Freisetzung und Wirkung in einem Säugerkörper.

5

Injizierbare liposomale Depots zum Wirkstoffdelivery

10 Die Erfindung betrifft ein liposomales Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung und die Verwendung dieses Systems in Grundlagenforschung und Klinik.

Peptid- und Proteinwirkstoffe werden im Körper nach
15 Applikation sehr schnell abgebaut oder ausgeschieden und müssen daher durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Um die „patient compliance“ zu erhöhen wird ein geeignetes Deliverysystem benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam in die Blutbahn freigibt. Dazu
20 werden Depotsysteme eingesetzt, die subkutan oder intramuskulär injiziert oder implantiert werden. Liposomen sind eine mögliche Form eines solchen Trägersystems. Sie sind aufgebaut aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten und umschliessen in ihrem Innern ein wässriges Kompartiment, in
25 welches wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können. In die Lipid-Doppelschicht können lipophile Substanzen eingebaut werden.

In J.Controll. Rel. 64 (2000) 155-166, in der US 5766627 und
30 anderen Schriften der Autoren werden multivesikuläre Aggregate aus Liposomen als injizierbares Depotsystem für Insulin, Leuprolide und Enkephalin vorgestellt, die durch einen Doppelemulsionsprozess gewonnen werden. Wegen des Zusatzes unpolarer Triglyceride sind diese multizentrischen Aggregate
35 nicht als Liposomen im engeren Sinne aufzufassen, da die Triglyceride keine Bilayermembranen bilden und nicht in solche eingebaut werden. Nachteilig ist weiterhin die Nutzung einer mit Wasser nicht mischbaren Ölphase zur Herstellung der Strukturen. Insbesondere beim Einschluss grösserer Proteine

führt das zur Denaturierung an der Grenzfläche. Ebenso stellen Reste organischer Lösungsmittel ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar.

5 Für Depotsysteme finden nach dem Stand der Technik Liposomen Verwendung, die aus neutralen, anionischen oder PEG-Lipiden zusammengesetzt sind, etwa in der WO 9920301 für ein Depot von γ -Interferon, in Diabetes 31 (1982), 506-511 für ein Depot von Insulin; weiterhin in Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991), 10440-
10 10444 zur Vakzinierung.

In BBA 1328 (1997), 261-272 werden verschiedene liposomale Systeme (unilamellar und multilamellar) aus Ei-PC, Ei-PG, DPPC, DPPG, PS und Cholesterol auf deren Aufnahme ins
15 Lymphsystem und der Bioverteilung nach subkutaner Gabe hin untersucht. Der Review-Artikel Advanced Drug Delivery Reviews 50 (2001), 143-156 schliesst an diese Untersuchungen an. Hier wird gezeigt, dass kleinere Liposomen (<150nm) aus einem subkutanen Depot in die Lymphe auswandern.

20 Nach dem Stand der Technik werden neutrale und negativ geladene Liposomen für liposomale Depotsysteme verwendet. Die Liposomen müssen eine Mindestgrösse aufweisen, um nicht in die Lymphe abzuwandern.

25 Die Herstellung grosser Liposomen von deutlich mehr als 150nm ist aber mit technischen und regulatorischen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere ist dann die wünschenswerte Sterilfiltration der Partikel nach deren Herstellung nicht
30 mehr möglich.

Neben Peptiden und Proteinen werden auch Oligonukleotide im Körper durch Enzyme sehr schnell abgebaut. Diese Wirkstoffe werden normalerweise in hohen Dosen durch intravenöse
35 Injektionen verabreicht, die jedoch häufig wiederholt werden müssen. Für eine verbesserte „patient compliance“ und um die Dosis verringern zu können, wird daher ein geeignetes Deliverysystem benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam und verzögert freisetzt.

Meist werden heute Delivery-Systeme verwendet, welche nach Verabreichung das intrazelluläre Delivery der Wirkstoffe unterstützen. Dazu zählen liposomale Systeme, polymerbasierte Systeme (z.B. PEI) und virale Carrier. Diese intrazellulären Delivery-Strategien können zu einer Dosisverringern

Eine weitere Möglichkeit Oligonukleotide zu verabreichen stellen Depotsysteme dar, die lokal appliziert werden und die Wirkstoffe gleichmäßig über einen bestimmten Zeitraum freisetzen. Diese Delivery-Strategien unterstützen das intrazelluläre Delivery der Wirkstoffe nicht zwingend, vielmehr führen sie zu einem steady-state Spiegel des Wirkstoffes über die Zeit im Blut oder Gewebe. Dadurch kann die Injektionshäufigkeit verringert werden und darüber hinaus ist durch das Aufrechterhalten der Wirkstoffkonzentration eine Dosisreduktion möglich.

Mikro- oder Nanopartikel aus biokompatiblen Polymeren stellen eine mögliche Form eines solchen Depotsystems dar. In US 6,555,525 wird die verzögerte Freisetzung von Antisense-Oligonukleotiden aus PLGA-Mikrokapseln nach subkutaner Injektion in einem Maus-Leukämie-Modell beschrieben. Die verzögerte Freisetzung von Oligonukleotiden aus PLGA-basierten Mikro-bzw. Nanokapseln wird in zahlreichen anderen Publikationen ebenfalls beschrieben (z.B. J. Drug Target. 5(4), 291-302, (1998); Gene Ther. 9 (23), 1607-16, (2002); Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9(5), 451-8, (1999), J. Control. Release 37, 173-183, (1995)).

In weiteren Druckschriften werden andere Polymer-basierte Systeme zum Delivery von Nukleinsäuren beschrieben. In Methods: A companion to Methods in Enzymology 18, 286-295, (1999) weisen die Autoren z.B. auf die mögliche Anwendung der beschriebenen Polyhexylcyanoacrylate-Nanopartikel als Depotsystem für Oligonukleotide hin.

Nachteilig der Mikro- oder Nanopartikel aus Polymeren ist deren Herstellungsprozess. Hier müssen in den meisten Fällen Emulsionsprozesse zur Anwendung kommen, unter Verwendung organischer, nicht mit Wasser mischbarer Lösungsmittel. Diese Lösungsmittel müssen nach Prozessende wieder vollständig entfernt werden. Dadurch stellen sie ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar. Darüber hinaus entstehen bei der Hydrolyse der PLGA-Kapseln sehr niedrige pH-Werte im Innern der Kapseln, wodurch die Integrität der eingeschlossenen Wirkstoffe Schaden nehmen kann. So ist es bekannt, dass Purinbasen bei niedrigen pH-Werten sich durch Hydrolyse vom Nukleinsäurerückgrat ablösen.

Liposomen sind ebenfalls eine mögliche Form eines Trägersystems für Oligonukleotide. Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung von meist kationischen liposomalen Systemen zum Delivery von Oligonukleotiden in vivo (z.B. Molecular Membrane Biology, 16, 129-140, (1999); BBA 1464, 251-261, (2000); Reviews in Biology and Biotechnology, 1(2), 27-33, (2001). All diesen Systemen gemein ist jedoch die Tatsache, dass die verwendeten Lipid-Mischungen aus ungesättigten Lipiden wie z.B. DOTAP oder DOPE aufgebaut sind und aus diesem Grund nicht serumstabil sind. Dadurch bedingt setzen diese Liposomen eingeschlossenen Wirkstoff sehr schnell nach der Injektion frei. Häufig werden für die oben genannten Anwendungen auch Komplexe aus vorgeformten Liposomen und Nukleinsäuren hergestellt (z.B. Lipoplexe). Die Komplexbildung bzw. die meist nicht im Serum stabilen liposomalen Formulierungen führen dazu, dass die Stabilität der Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, wie für ein Depot erforderlich, nicht gewährleistet ist.

Aufgabe der Erfindung war es daher, neue stabile liposomale Depotformulierungen für Protein- und Peptidwirkstoffe, sowie für Oligonukleotide bereitzustellen, die eine langfristige Freisetzung des Wirkstoffes über mindestens eine Woche erreichen und eine gute Verträglichkeit im Organismus aufweisen. Eine weitere Aufgabe war es, Depotssysteme bereitzustellen, die keinen „burst release“ des Wirkstoffes

aufweisen, oder die, wenn es therapeutisch angezeigt ist, eine initiale schnelle Teilfreisetzung des Wirkstoffes erzielen, gefolgt von einer lang anhaltenden Freisetzung des Wirkstoffes.

5

Diese technische Aufgabe wird gelöst durch ein Depotsystem, insbesondere zur verzögerten Wirkstofffreisetzung, wobei es Liposomen (a) mit gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen, ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC und/oder DSPC, (b) Cholesterol mit einem Anteil von 35 bis 50 mol%, (c) kationische Lipide, ausgewählt aus der Gruppe DC-Chol, DAC-Chol, DMTAP, DPTAP und/oder DOTAP mit einem Anteil von 5 bis 20 mol% an der Liposomenmembran (d) und einen Protein- und/oder Peptidwirkstoff umfasst, wobei die Formulierung der Wirkstoffe in Liposomen bei der Anwendung als Depot in Form von Aggregaten vorliegen. Solche Liposomen umfassen bevorzugt neben neutralen Lipiden auch kationische Lipide.

Positiv geladene Liposomen aggregieren z.B. gut mit Komponenten des Serums oder der Interstitialflüssigkeit und verbleiben in diesem Zustand an der Einstichstelle. Ein Wegdiffundieren des Depots von der Einstichstelle wird damit vorteilhafterweise vermieden.

25

Die Depots können so beschaffen sein, dass sie einen burst release ermöglichen oder diesen nicht ermöglichen. Depots ohne burst release können dadurch bereitgestellt, dass aussen an den Liposomen anhaftender Wirkstoff abgelöst und abgetrennt wird. Wenn ein burst relase vorteilhaft ist, wird der aussen an den Liposomen anhaftende Wirkstoff nicht abgelöst und abgetrennt.

Verschiedene Verfahren zum Einschluss des insbesondere wasserlöslichen Wirkstoffs in Liposomen des Depotsystems sind dem Fachmann bekannt. Für den Einschluss des gewünschten Wirkstoffes in die Liposomen wird dieser beispielsweise in einer Pufferlösung gelöst, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden. Bei dem sogenannten passiven Einschluss

zählt das relative Volumen, das von den gebildeten Liposomen umschlossen wird. Die Einschlusseffizienz wird beim passiven Einschluss mit zunehmender Lipidkonzentration gesteigert, da das von der Lipiddoppelschicht umschlossene Flüssigkeitsvolumen zunimmt.

Die anmeldungsgemäße Lehre weist eine Reihe von Vorteilen auf. Bekannt sind bisher neutrale/negativ geladene Liposomen, bzw. Mikro- und Nanopartikel aus Polymeren für die oben genannten Aufgaben verwendet worden.

Die erfindungsgemäßen Liposomen aggregieren mit Serumkomponenten und Komponenten der Interstitialflüssigkeit, wodurch das Depot an der Einstichstelle verbleibt und somit z.B. ein Abwandern in die Lymphe verhindert wird. Die erfindungsgemäße Lipidzusammensetzung enthält gesättigte Gerüstlipide, was für eine Integrität der Liposomen auch im aggregierten Zustand sorgt und so für einen besseren Schutz des Wirkstoffes, bzw. für eine längere Depotdauer. Der Herstellungsprozess kommt ohne organische, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel aus, die für regulatorische Probleme sorgen können, da schwierig vollständig zu entfernen oder den Wirkstoff (Proteine) schädigen. Es gibt keine Abbauprodukte, wie bei Mikro- und Nanopartikel aus Polymeren, welche dem Wirkstoff schaden können (saure Reaktion bei Abbau von PLGA-Kapseln). Variabel durch mit/oder ohne burst release Charakter des Depotsystems, je nach Anforderungen von Therapie und Wirkstoff.

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Liposomen, die aus neutralen und kationischen Lipiden aufgebaut sind, als liposomales Depotsystem für die verzögerte Freisetzung von therapeutischen Peptiden und Proteinen verschiedenster Molmassen eingesetzt. In J. Pharm. Sci., 89 (3), 297-310, 2000 wird die absolute Bioverfügbarkeiten verschieden großer Peptide und Proteine nach subkutaner Applikation beschrieben, wobei mit zunehmender Molmasse keine signifikante Verringerung der Bioverfügbarkeit beobachtet wird.

Da therapeutische Peptide und Proteine im Körper sehr schnell abgebaut werden, müssen diese durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Peptide und Proteine, deren Analoga, zugehörige
5 Peptide, Fragmente, Inhibitoren und Anatagonisten, umfassen:

Transforming growth factors (TGF-alpha, TGF-beta), Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-3), Interferone (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma), Calcitonine, Insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2), Parathyroid hormone, Granulozyten-stimulierender Faktor (GCSF), Granulozyten-Makrophagen
10 stimulierender Faktor (GMCSF), Makrophagen stimulierender Faktor (MCSF), Erythropoetin, Insuline, Amyline, Glucagone, Lipocortine, Wachstumshormone, Somatostatin, Angiostatin, Endostatin, Octreotid, Gonadotropin releasing hormone (GNRH), Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) und wirksame Agonisten wie Leuprolidacetat, Buserelin, Goserelin, Triptorelin; Platelet-derived growth factor;
20 Blutgerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII, Faktor IX), Thromboplastin-Aktivatoren, Gewebe Plasminogen Aktivatoren, Streptokinase, Vasopressin, Muramyl-dipeptide (MDP), Atrial natriuretic factor (ANF), Calcitonin gene-related Peptid (CGRP), Bombesin, Enkephaline, Enfuvirtide, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF), Growth hormone releasing hormone (GRH), Bone morphogenetic proteins (BMP), Antikörper und Antikörperfragmente (z.B. scFv-Fragmente, Fab-Fragmente),
25 Peptid T und Peptid T Amide, Herpes Virus Inhibitor, Virus Replikations Inhibitions Faktor, Antigene und Antigenfragmente, lösliches CD4, ACTH und Fragmente, Angiotensine, und ACE Inhibitoren, Bradykinin (BK), Hypercalcemia malignancy factor (PTH like adenylate cyclase-stimulating protein), beta-casomorphins, chemotactic peptides and inhibitors, corticotropin releasing factor (CRF),
35 caerulein, cholecystokinins + Fragmente und Analoga, Galanin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), gastrins, gastrin releasing peptide (GRP), motilin, PHI peptides, PHM peptides, peptide YY, secretins, melanocyte stimulating hormone (MSH),

neuropeptide Y (NPY), neuromedins, neuropeptide K, neurotensins, phosphate acceptor peptide (c-AMP protein kinase substrates), Oxytocine, substance P, TRH - sowie Fragmente, Analoga und Derivate dieser Stoffe.

5

Eine weitere bevorzugte Wirkstoffklasse für erfindungsgemäße liposomale Depots sind Oligonukleotide. Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Nukleotiden oder Basenpaaren aufgebaut. Darüberhinaus können die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-Oligonukleotide), als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotide) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmere, Ribozyme) vorliegen. Alle für diese 15 Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus Desoxyribonukleotiden oder aus Ribonukleotiden sowie aus deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut (z.B. Phosphorothioate DNA (PS), 2'-O-methyl RNA (OMe), 2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE), Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5' 20 Phosphoroamidate (NP), 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA), Locked nucleic acid (LNA), Morpholino phosphoroamidate (MF), Cyclohexene nucleic acid (CeNA), Tricyclo-DNA (tcDNA)). Darüber können Copolymere und Block-Copolymere verschiedener Nukleotide und sogenannte Gapmere in die Liposomen 25 eingeschlossen werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden Aptamere oder Spiegelmere in das liposomale Depot eingeschlossen. Aptamere sind DNA- oder RNA-basierte 30 Oligonukleotide mit komplexer dreidimensionaler Struktur. Aufgrund dieser Struktur können Aptamere sehr spezifisch und hochaffin an Proteintargets binden und wirken somit therapeutisch, meist extrazellulär. Ihre Funktionalität ist nahezu identisch zu monoklonalen Antikörpern.

35

Spiegelmere sind im Gegensatz zu D-Oligonukleotiden aus L-Ribose- und L-2'-Desoxyribose-Einheiten aufgebaut. Genau wie Aptamere binden diese spiegelbildlichen Nukleinsäuren spezifisch an Proteintargets. Aufgrund der chiralen Inversion

besitzen Spiegelmere im Gegensatz zu herkömmlichen D-Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau.

- 5 Desweiteren sind für diese Erfindung auch wasserlösliche Wirkstoffe oder wasserlösliche Wirkstoff-Derivate folgender Wirkstoffklassen relevant: Antibiotika (z.B. Rifamycin SV Na-Salz, Rifampicin, Tetracyclinhydrochlorid, Kanamycin, Penicillin G, Ampicillin, Novobiocin), Antimykotika (z.B. Amphotericin B, Flucytosin), Cytostatika (z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, Cytarabin), Glucocorticoide (Dexamethason, Prednisolon, Hydrocortison, Betamethason).

- 15 Neben den genannten Wirkstoffklassen können auch Kohlenhydrate wie z.B. Heparin oder Hyaluronsäure für diese Erfindung relevante Wirkstoffmoleküle sein. Keine bevorzugten Wirkstoffe im Sinne der Erfindung sind Membranproteine, die sich schlecht in den Innenraum von Liposomen einbringen lassen.

- 20 Als Liposomenbildner kommen membranbildende und membranständige Lipide in Frage, wobei diese natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Hierzu zählen insbesondere Cholesterol und Derivate, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine als neutrale Lipide. Besonders
25 bevorzugt werden die vollständig gesättigten Verbindungen dieser Klasse verwendet, wie beispielsweise die Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder Distearoyl-derivate der Phosphatidylcholine (DMPC, DPPC, DSPC) und der Phosphatidylethanolamine.

- 30 Kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen beispielsweise:

- | | |
|--------------------------|--|
| DAC-Chol | 3-β-[N-(N,N'-dimethylaminoethane) |
| 35 carbamoyl]cholesterol | |
| DC-Chol | 3-β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane) |
| carbamoyl]cholesterol | |
| TC-Chol | 3-β-[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl] |
| cholesterol | |

BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol

BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,

DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid

5 DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid)

DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)
(Lipofectin®)

DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl
ammoniumbromid)

10 DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester)

DOGSOSO (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinyl-2hydroxyethyl
disulfide ornithin),

DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid

15 DOGS ((C18)₂GlySper3⁺) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin
(Transfectam®)

(C18)₂Gly⁺ N,N-dioctadecylamido-glycin

DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin oder andere
O-Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,

20 1,3-bis-(1,2-bis tetradecyloxy-propyl-3 dimethylethoxy
ammonium-bromid) propan- 2-ol (Neophectin®),

sowie von allen genannten Lipiden mit ungesättigten Fettsäure-
und/oder Fettalkoholketten deren gesättigte Derivate mit
Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, oder Distearoylketten.

25

Bevorzugte kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung
umfassen Cholesteryl 3β-N-(Dimethyl-aminoethyl)carbamat (DC-
Chol), 3-β-[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol
(DAC-Chol), (N-[1-(2,3-Dimyristoyloxy)propyl]-N,N,N-

30 trimethylammonium Salz (DMTAP), (N-[1-(2,3-
Dipalmitoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz
(DPTAP), (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium
Salz (DOTAP).

35

In einer besonders bevorzugten Zusammensetzung werden
gesättigte synthetische Phosphatidylcholone, wie DMPC, DPPC
oder DSPC, Cholesterin, die kationischen Lipide DC-Chol, DAC-
Chol, DMTAP, DPTAP oder DOTAP verwendet, wobei ganz besonders

bevorzugt der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil von Cholesterol zwischen 35 und 50% beträgt.

5 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden pH-sensitiv kationische Lipide eingesetzt, wie sie in WO 02 066490 und US 5965434 beispielhaft offenbart sind. Liposomen, die diese Lipide enthalten, können durch pH-Wechsel in einen neutralen Ladungszustand gebracht werden und
10 ermöglichen eine einfache Abtrennung von aussen anhaftendem Wirkstoff, während des Herstellungsprozesses. Beispiele für pH-sensitiv kationische Verbindungen sind:

Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat (His-Chol),
Morpholin-N-ethylamino-cholesterolhemisuccinat (Mo-Chol),
15 4-(2,3-bis-palmitoyloxy-propyl)-1-methyl-1H-imidazol (DPIM),
Cholesterol-(3-imidazol-1-yl propyl) carbamat (CHIM).

Die Größe der erfindungsgemäßen Liposomen variiert von 20-1000 nm, bevorzugt von 50-800 nm und ganz besonders bevorzugt von
20 50-300 nm.

Für die Herstellung der Liposomen werden nach dem Stand der Technik etablierte Verfahren, wie Extrusion durch Polycarbonat-Membranen, Ethanolinjektion oder
25 Hochdruckhomogenisation verwendet.

Der passive Einschluss wird bevorzugt dann verwendet, wenn große Mengen eines gut löslichen Wirkstoffes eingeschlossen werden sollen. Dafür werden Liposomen mit einer
30 Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM in Gegenwart des gelösten Wirkstoffes hergestellt.

35 Ein weiteres Verfahren zum Einschluß von wasserlöslichen Wirkstoffen ist das sogenannte „Advanced Loading“-Verfahren, welches in der in WO 01/34115 A2 beschrieben ist, die in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Erfindung mit aufgenommen wird. Dieses Verfahren ermöglicht eine hohe

Einschlusseffizienz. Es wird bevorzugt dann verwendet, wenn der Wirkstoff möglichst kostensparend in die Liposomen eingeschlossen werden soll. Bei diesem Verfahren, das auf einer Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und membranbildenden Substanzen beruht, wird bei niedrigen Ionenstärken und bei einem pH-Wert gearbeitet, bei welchem der Wirkstoff in einem anionischen Ladungszustand vorliegt, um mit der kationischen Liposomenmembran eine reversible elektrostatische Wechselwirkung einzugehen.

Für viele Proteine oder Peptide ist das unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 der Fall. Die Ladung der Wirkstoffe bei einem gegebenen pH kann aus Datenbanken entnommen werden, etwa der SWISS-PROT oder lässt sich nach bekannten Algorithmen berechnen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das passive Einschlussverfahren mit dem Advanced Loading Prozess kombiniert. Bei diesem Verfahren wird der Advanced Loading Prozess mit einer Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM durchgeführt, um die Einschlussraten gegenüber den einzelnen Verfahren signifikant zu erhöhen.

Nach der Liposomenpräparation kann aussen an der Liposomenmembran anhaftender Wirkstoff von der Oberfläche der Liposomen abgelöst und entfernt werden. Dieser Schritt ist von zentraler Bedeutung für die Eigenschaften des liposomalen Depots. Wird der Wirkstoff von der Liposomenoberfläche abgelöst und aus der Liposomensuspension entfernt, so werden Depotformulierungen erhalten, die praktisch keinen oder einen nur minimalen „burst release“ zeigen. Dieses Merkmal ist insbesondere von zentraler Bedeutung, wenn Wirkstoffe verabreicht werden sollen, bei denen schon eine kurzzeitige hohe Wirkstoffkonzentration, wie dies bei der initialen Anflutung der Fall ist, zu toxischen Reaktionen im Körper führen kann. Ein Beispiel hierfür ist Insulin, dessen Überdosierung zu lebensbedrohlichen hypoglykämischen

Zuständen führen kann. Die Auflösung der bestehenden Wechselwirkung kann beispielsweise durch Änderung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke bewirkt werden.

- 5 Die entgültige Abtrennung kann durch dem Fachmann bekannte Verfahren, wie Zentrifugation, Ultrafiltration, Dialyse oder andere chromatische Verfahren erfolgen, so dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10%, bevorzugt weniger als 5% des Wirkstoffes sich
10 ausserhalb des Liposoms befinden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff nicht von der Membran abgelöst, d.h. der pH-Wert oder die Ionenstärke werden
15 nicht verändert. Diese Ausführungsform findet insbesondere Anwendung bei Wirkstoffen, bei denen ein initiales Anfluten des Wirkstoffes toxikologisch unbedenklich ist, wie beispielsweise bei Leuprolidacetat oder vielen Antikörpern.

- 20 Der freie Wirkstoff verbleibt ganz oder teilweise, aber zu mehr als 5%, bevorzugt mehr als 10% in der Liposomensuspension und sorgt für das schnelle initiale Anfluten des Wirkstoffes im Blut.

- 25 Ein weiterer Vorteil dieser Ausführung liegt in der Lyophilisierbarkeit der Suspension, da eine Freisetzung des innen eingeschlossenen Wirkstoffes während des Lyophilisationsvorganges minimiert wird, da sowohl auf der Innen- wie auf der Außenseite der Membran die gleich
30 Wirkstoffkonzentration vorliegt.

Leuprolidacetat ([D-Leu⁶Pro⁹Des-Gly¹⁰]-LHRH Ethylamid) ist ein synthetisch hergestellter Agonist des LHRH (luteneizing hormone releasing hormone) und wird klinisch vor allem bei
35 Prostatakrebs, Endometriose und vorzeitiger Pubertät eingesetzt, um den Androgenspiegel im Serum zu senken. Die kontinuierliche Gabe von Leuprolidacetat führt zunächst zu einer Erhöhung des Testosteronspiegels, bevor dieser dann bis auf das Kastrationsniveau gesenkt wird. Der initiale Anstieg

des Testosterons ist zurückzuführen auf eine Stimulation der LHRH Rezeptoren in der Hypophyse und der dadurch ausgelösten Ausschüttung von LH, welches wiederum die Testosteronproduktion im Hoden stimuliert. Nach der
5 anfänglichen Stimulation durch Leuprolidacetat kommt es schließlich zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren in der Hypophyse, wodurch die Ausschüttung von LH inhibiert wird. Dies führt dann zu einer Absenkung des Testosteronspiegels. In einer besonders bevorzugten Ausführung der Erfindung wird
10 Leuprolidacetat als Wirkstoff eines erfindungsgemäßen Depotsystems verwendet.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Antigene oder Antigenfragmente als Wirkstoffe eines
15 erfindungsgemäßen Depotsystems zur Vakzinierung verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden therapeutisch nutzbare Insuline als Wirkstoffe für ein erfindungsgemäßes Abgabesystem eingesetzt.

20 Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet werden. In einem vorbereitenden Schritt werden die liposomalen Formulierungen in ein physiologisch verträgliches Medium gebracht. Die Bedingungen eines physiologisch verträglichen Mediums sind dem
25 Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise einen pH-Wert von 7,3 bis 7,6, bevorzugt 7,4 bis 7,5, einen Salzgehalt der ca. 150 mM NaCl entspricht, bzw. einer Osmolarität von etwa 320 mos.

30 Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können als Depotarzneiform subkutan oder intramuskulär initiiert werden. Weiterhin können sie auch lokal oder topisch appliziert werden.

35 Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der das erfindungsgemäße Depotsystem umfasst, ggf. mit einer Information zum Kombinieren der Inhalte des Kits. Der Kit kann in Grundlagenforschung und Medizin angewandt werden. Die Information kann z.B. auch ein Hinweis auf eine

Internetadresse sein, unter der weitere Informationen erhalten werden können. Die Information kann ein Behandlungsschema für eine Krankheit sein oder beispielsweise eine Gebrauchsanleitung zum Handhaben des Kits in der Forschung.

5

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

Beschreibung der Abbildungen

10

Abbildung 1

Vergleich der liposomalen Depotsysteme aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (K 3) im Tiermodell

15

Abbildung 2

Vergleich der liposomalen Depotsysteme mit Leuprolidacetat aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (P29) im Tiermodell (Serumspiegel Leuprolidacetat)

20

Abbildung 3

Vergleich der liposomalen Depotsysteme mit Leuprolidacetat aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (P29) im Tiermodell (Serumspiegel Testosteron)

25

Abbildung 4

Liposomales Depotsystem mit Leuprolidacetat aus Beispiel 7 der vorliegenden Erfindung im Tiermodell (Serumspiegel Leuprolidacetat)

30

Beispiele

5 Beispiel 1

Einschluss von Insulin in Liposomen

Lipidmischungen folgender Zusammensetzung

Formulierung	Zusammensetzung
I-1	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)
I-2	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)

10

wurden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel Human-Insulin-Lösung (rekombinantes Insulin) (4mg/ml Insulin in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension durch Schwenken über 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

20

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die erhaltene Suspension durch Zugabe einer Stammlösung Glycin-HCl, pH 3,5 und NaCl umgepuffert. Nach einer Filtration der Liposomen durch 0,8 µm erfolgt die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen Insulins durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000x g, 45 min. Durch Zugabe einer HEPES- Stammlösung, pH 7,5 wird wieder ein physiologischer pH eingestellt. Die Menge des eingeschlossenen Insulins wird nach einer Extraktion mit CHCl₃ und CH₃OH mittels RP-HPLC bestimmt.

25

30

Es ergeben sich Einschlussraten von 80-100 % Insulin.

5 Beispiel 2

Einschluss von Alkalischer Phosphatase (AP) in Liposomen

Eine Lipidmischung der folgender Zusammensetzung:

10

Formulierung	Zusammensetzung
AP-1	DPPC/DOTAP/Chol
	50:10:40 (mol%)

wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel AP-Lösung (from bovine intestinal mucosa) (5 mg/ml AP in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die Ionenstärke der erhaltenen Suspension durch Zugabe einer Stammlösung NaCl erhöht.

30

Die Abtrennung der nicht-eingeschlossenen AP erfolgt durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min.

35

Die Menge der eingeschlossenen AP wird nach einer organischen

Fällung mit CHCl_3 und CH_3OH mittels eines Protein-Assays (BCA Protein Assay Reagent Kit, Perbio) ermittelt. Darüberhinaus wird die Aktivität der eingeschlossenen AP mittels eines Enzymassays (p-Nitrophenylphosphat Test) bestimmt. Es ergeben
5 sich Einschlußsraten von 40-50 % AP.

Beispiel 3

10 Einschluß von Inulin in Liposomen

Lipidmischungen folgender Zusammensetzung:

Formulierung	Zusammensetzung
P-20	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)
P-21	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)
P-23	DPPC/DPPG 40:60 (mol%)

15 werden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel ^3H -Inulin-Lösung (18,5 MBq/ml ^3H -Inulin in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) versetzt, dass eine 100mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese
20 Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen weitere 3 Einfrier- und Auftauprozesse. Nach dem dritten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200 nm extrudiert
25 (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite 200 nm). Die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen ^3H -Inulins erfolgt über eine Gelfiltration (G75-Säule, Pharmacia). Die Menge des eingeschlossenen ^3H -Inulins wird nach der Abtrennung im Scintillationszähler bestimmt. Es ergeben sich
30 Einschlußsraten von 10-25 % ^3H -Inulin.

Beispiel 4

Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell

5 Die verschiedenen Liposomen nach Beispiel 3 wurden in einer
 Konzentration von 20mM Lipid in einem Volumen von 0,5mL
 subkutan in gesunde Ratten (3 Tiere pro Gruppe) injiziert.
 Eine Kontrollprobe mit Leerliposomen und nicht verkapseltem ³H-
 Inulin wurde ebenfalls in einem Volumen von 0,5 mL subkutan
 10 verabreicht. Die pharmakokinetischen Daten wurden durch
 Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Die
 gesamte Versuchsdauer der Tierstudie betrug 6 Wochen. Das
 Allgemeinbefinden aller Tiere war über die Versuchsdauer gut.
 Nur ein Tier der Gruppe P20 zeigte am Versuchstag 10 für ca.
 15 1h starke Atemgeräusche.

Die Inulingehalte wurde Verbrennen der Blutproben (Oxidizer Ox
 500, Zinser) und anschliessender Scintillationsmessungen
 bestimmt.

Die Formulierungen und die relativen Bioverfügbarkeiten bis
 20 t=42 d sind in folgender Tabelle dargestellt:

Formulierung	Zusammensetzung	Relative Bioverfügbarkeit bis t=42 Tage [%]
K-3	DPPC/DPPG/Chol 50:10:40 (200 nm) + 3H-Inulin aussen	100
P-20	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (200 nm)	136,5
P-21	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (200 nm)	120
P-23	DPPC/DPPG 40:60 (200 nm)	142

Beispiel 5

Einschluss von Leuprolidacetat in Liposomen

- 5 Lipidmischungen der folgenden Zusammensetzung:

Formulierung	Zusammensetzung
P-26	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)
P-27	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)
L1	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%) (ohne Abtrennung)

- werden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der
- 10 Lipidfilm wird mit soviel Leuprolidacetat-Lösung (95 mg/ml in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6, L1: 2,5 mg/ml) versetzt, dass eine 100 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert. Danach wird die Suspension
- 15 eingefroren. Es folgen weitere 3 Einfrier- und Auftauprozesse. Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite 400 nm). Die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen
- 20 Leuprolidacetats erfolgt durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min (nicht für L1). Die Menge des eingeschlossenen Leuprolidacetats wird nach einer Extraktion mit CHCl₃ und CH₃OH mittels RP-HPLC bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von ca. 15 % Leuprolidacetat.

Beispiel 6

Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell

5 Die verschiedenen Liposomen nach Beispiel 5 wurden in einer
Konzentration von 25-30mM Lipid in einem Volumen von 0,5mL
subkutan in gesunde männliche Ratten (3 Tiere pro Gruppe)
injiziert. Eine Kontrollprobe mit Leerliposomen und nicht
verkapseltem Leuprolidacetat wurde ebenfalls in einem Volumen
10 von 0,5 mL subkutan verabreicht. Die pharmakokinetischen Daten
wurden erhalten durch Blutabnahmen zu verschiedenen
Zeitpunkten, das Gewinnen von Serum und die Bestimmung der
Leuprolidacetatkonzentration im Serum mittels ELISA
(Peninsula).

15 Da Leuprolidacetat den Testosteronspiegel der männlichen
Ratten beeinflusst, wurde die Testosteronkonzentration im
Serum ebenfalls über den gesamten Zeitraum mittels ELISA
(DRG) bestimmt. Die gesamte Versuchsdauer der Tierstudie betrug
20 6 Wochen. Das Allgemeinbefinden aller Tiere war über die
Versuchsdauer gut. Die Formulierungen und die relativen
Bioverfügbarkeiten bis t=42 d sind in folgender Tabelle
dargestellt:

25

Formulierung	Zusammensetzung	Größe [nm]	Relative Bioverfügbarkeit bis t=42 Tage [%]
P-29	DPPC/DC- Chol/Chol 60:10:30 + Leuprolid aussen	290	100
P-26	DPPC/DC- Chol/Chol 60:10:30	305	117

Beispiel 7

Einsatz von liposomalen Leuprolidacetat im Tiermodell

- 5 Die Liposomen nach Beispiel 5 wurden ohne Abtrennung des
 aussen vorliegenden Wirkstoffes in einem Volumen von 0,5mL
 subkutan in gesunde männliche Ratten (3 Tiere pro Gruppe)
 injiziert. Die Leuprolidacetat-Dosis pro Tier betrug 2,5 mg.
 Die pharmakokinetischen Daten wurden erhalten durch
 10 Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, das Gewinnen von
 Serum und die Bestimmung der Leuprolidacetatkonzentration im
 Serum mittels ELISA (Peninsula). Die gesamte Versuchsdauer der
 Tierstudie betrug 6 Wochen. Das Allgemeinbefinden aller Tiere
 war über die Versuchsdauer gut. Die Formulierung zeigt
 15 folgende Tabelle:

Formulierung	Zusammensetzung	Dosis
		[mg]
L1	DPPC/DC- Chol/Chol 60:10:30 keine Abtrennung	2,5

Beispiel 8

20

Einschluss von Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-Oligonukleotid)
 in Liposomen

Ein Lipidmischung folgender Zusammensetzung:

25

Formulierung	Zusammensetzung
AS1	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)

wird bei 50°C in Chloroform gelöst und anschließend im
 Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der
 Lipidfilm wird mit soviel Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-

Oligonukleotid) (150 µg/ml in 10 mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 15 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5
5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch
10 eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die Ionenstärke der erhaltenen Suspension durch Zugabe einer NaCl-Stammlösung erhöht.

15 Der Anteil des eingeschlossenen Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-Oligonukleotid) wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Wirkstoffes durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min
20 fluoreszenzspektroskopisch ermittelt.

Die Einschlusseffizienz des Oligonukleotids liegt bei 47%.

Patentansprüche

- 5 1. Depotsystem, insbesondere zur verzögerten
Wirkstofffreisetzung, dadurch gekennzeichnet, dass es
Liposomen
mit gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen,
ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC und/oder DSPC,
10 - Cholesterol mit einem Anteil von 35 bis 50 mol%,
- kationische Lipide, ausgewählt aus der Gruppe DC-Chol,
DAC-Chol, DMTAP, DPTAP und/oder DOTAP mit einem Anteil von
5 bis 20 mol% an der Liposomenmembran,
und mindestens einen Protein- und/oder Peptidwirkstoff
15 umfasst.
2. Depotsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
die kationischen Lipide pH-sensitiv kationisch sind und
ausgewählt aus der Gruppe His-Chol und/oder Mo-Chol.
20
3. Depotsystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im
Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% sich
außerhalb des Liposoms befindet.
25
4. Depotsystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass der Wirkstoff im Liposom
eingeschlossen ist und mehr als 10% sich außerhalb des
Liposoms befindet.
30
5. Depotsystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung nach
einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
dass die Abgabe des Wirkstoffes mindestens 1 Woche anhält.
- 35 6. Depotsystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass die Größe der Liposomen variiert von
20-1000 nm, insbesondere von 50-800 nm, bevorzugt von 50-
300 nm.

7. Verwendung des Depotsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur subkutanen oder intramuskulären Applikation.
8. Verwendung des Depotsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 6 für ein Depot von LHRH-Agonisten und/oder GnRH-Analoga, wobei das Depotsystem insbesondere Leuprolidacetat, Buserelin, Goserelin und/oder Triptorelin als umfasst.
9. Verwendung eines Depotsystems nach Anspruch 1, 2 oder 3 für ein Depot für Insulin, wobei der Peptidwirkstoff ein therapeutisch nutzbares Insulin umfassen.
10. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche für ein Depot von Heparin, wobei der Wirkstoff Heparin umfasst.
11. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche für ein Depot von Antigenfragmenten zur Vakzinierung.
12. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche zur verzögerten Wirkstofffreisetzung über mindestens eine Woche, wobei das Depotsystem Oligonukleotide umfasst.
13. Verwendung nach dem vorangegangenen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden oder deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut sind.
14. Verwendung nach dem vorangegangenen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide als Einzelstrang, insbesondere Antisense-Oligonukleotide, als Doppelstrang, insbesondere small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotiden und/oder in komplexer Faltung, insbesondere Aptamere und/oder Spiegelmere, vorliegen.
15. Verwendung des Depotsystems nach einem der Ansprüche 1-6

zur Herstellung eines Arzneimittels.

16. Verwendung des Depotsystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur topischen und lokalen Anwendung, insbesondere zur Unterstützung von Heilungsprozessen.
17. Verwendung des Depotsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur verzögerten Freisetzung eines Wirkstoffes über mindestens eine Woche, wobei der Wirkstoff ein wasserlösliches Wirkstoff-Derivat ausgewählt aus den Wirkstoffklassen der Antibiotika, Antimykotika, Cytostatika oder der Glucocorticoide umfasst.
18. Kit umfassend mindestens ein Depotsystem nach einem der Ansprüche 1 - 6 gegebenenfalls zusammen mit einer Information zum Kombinieren der Inhalte des Kits.

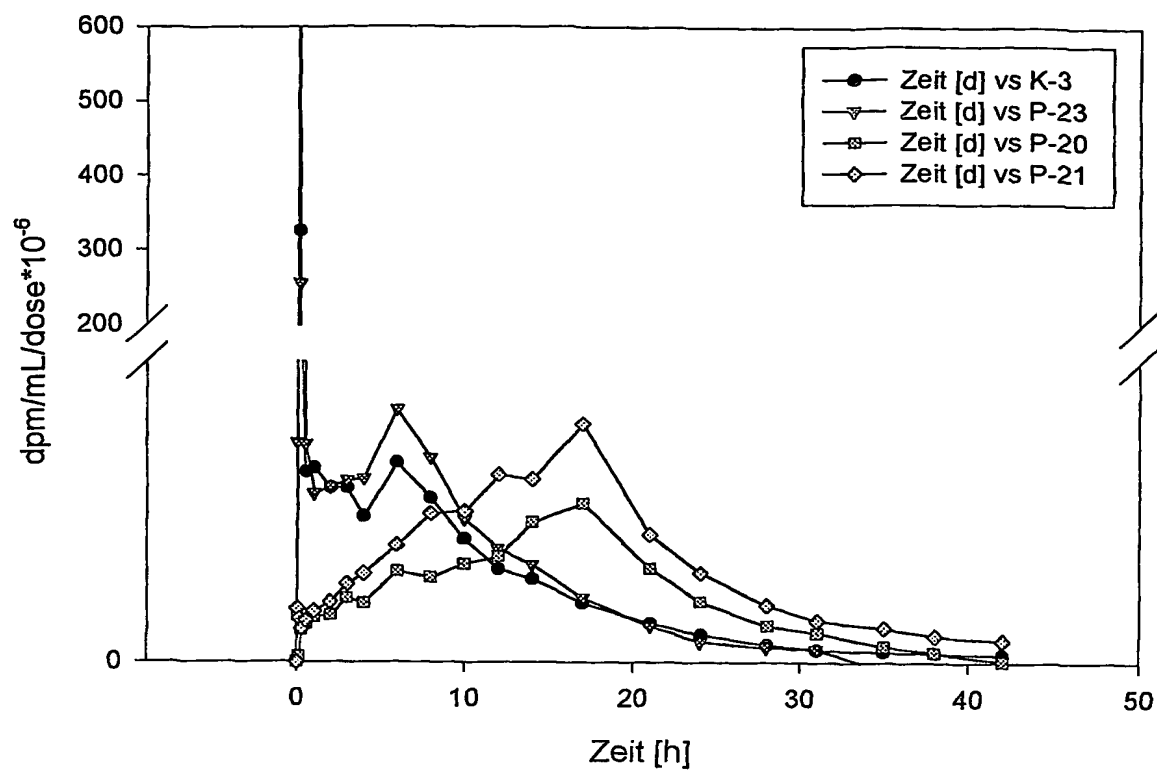


Abbildung 1

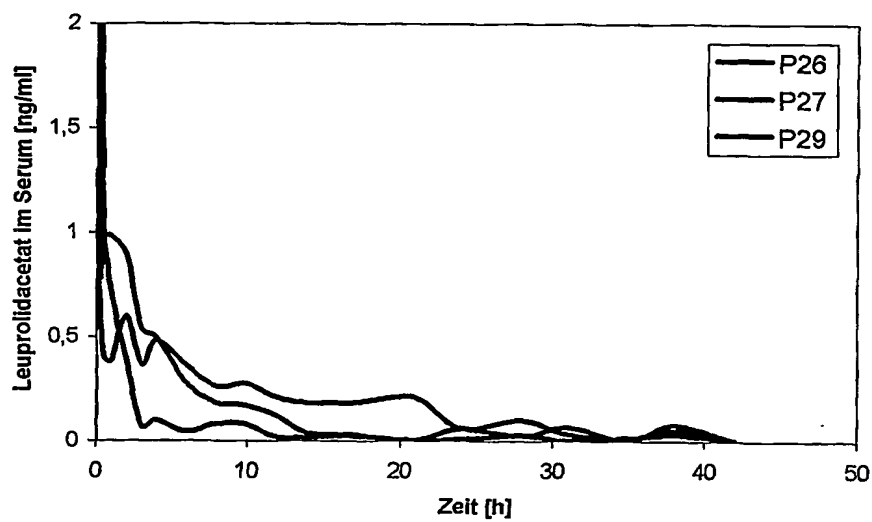


Abbildung 2

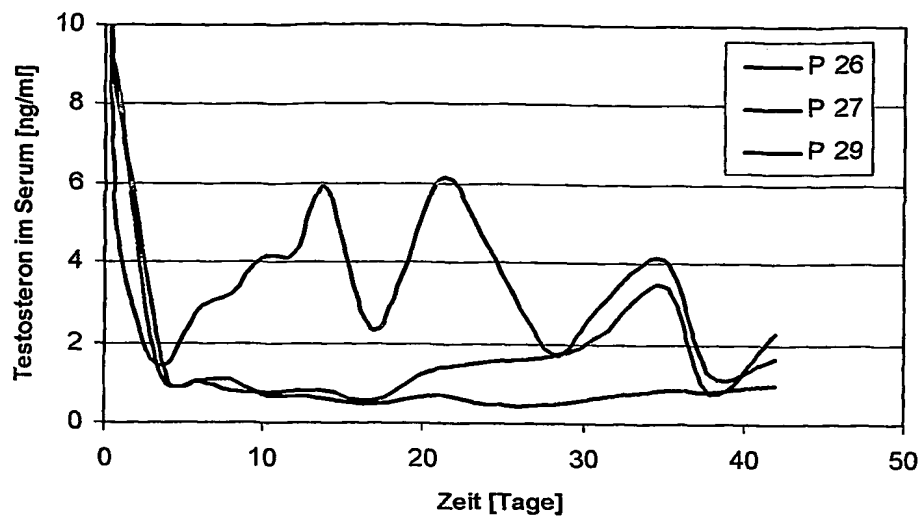


Abbildung 3

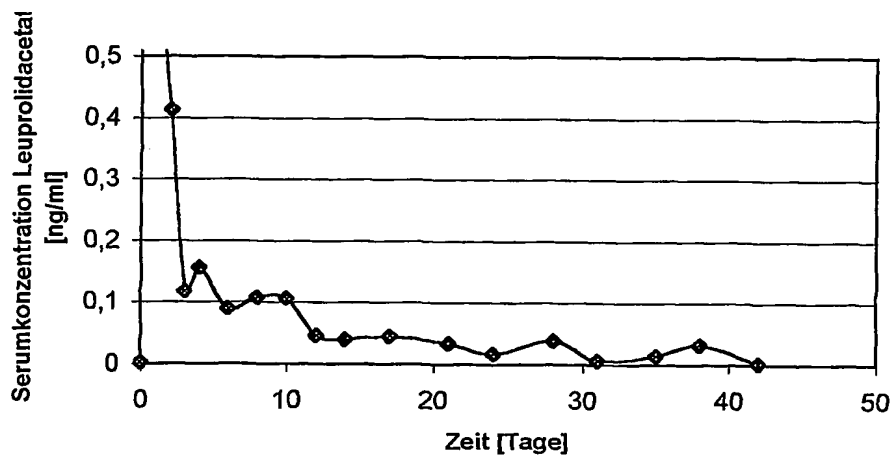


Abbildung 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/24773 A (GREGORIADIS GREGORY ; LIPOXEN LTD (GB); PERRIE YVONNE (GB)) 12 April 2001 (2001-04-12) examples 2,3	1, 18
X	WO 01/85142 A (ZHU MING ; RAGHAVACHARI NALIMI (US); KINK JOHN (US); FAHL WILLIAM E (U) 15 November 2001 (2001-11-15) page 28 - page 31; claim 19	1, 7, 9-16, 18
X	WO 00/27359 A (PILKIEWICZ FRANK G) 18 May 2000 (2000-05-18) page 8	1
X	WO 03/013245 A (KINK JOHN A ; FAHL WILLIAM E (US); WISCONSIN ALUMNI RES FOUND (US)) 20 February 2003 (2003-02-20) example 4	1, 7, 18
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 2004

Date of mailing of the international search report

05/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ESTANOL, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000998

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p> ZI CHEN LI ET AL: "SYNTHESIS OF CHOLESTEROL DERIVATIVES WITH AMINO ACID AS HYDROPHILIC GROUP AND THE VESICLES PREPARED THEREFROM" CHINESE CHEMICAL LETTERS, XX, XX, vol. 12, no. 10, 1999, pages 1007-1010, XP008005314 ISSN: 1001-8417 the whole document </p>	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

DE04/00998

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

PCT Rule 39.1(iv) - method for treatment of the human or animal body by therapy

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000998

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0124773	A	12-04-2001	AU 7540500 A	10-05-2001
			CA 2386024 A1	12-04-2001
			CN 1376056 T	23-10-2002
			EP 1217989 A1	03-07-2002
			WO 0124773 A1	12-04-2001
			JP 2003529550 T	07-10-2003
WO 0185142	A	15-11-2001	AU 5948401 A	20-11-2001
			CA 2408152 A1	15-11-2001
			EP 1280556 A1	05-02-2003
			JP 2004515453 T	27-05-2004
			WO 0185142 A1	15-11-2001
WO 0027359	A	18-05-2000	AU 766703 B2	23-10-2003
			AU 1621200 A	29-05-2000
			CA 2351063 A1	18-05-2000
			CN 1332626 T	23-01-2002
			CZ 20011581 A3	12-12-2001
			EP 1128813 A1	05-09-2001
			HU 0104255 A2	28-03-2002
			JP 2002529393 T	10-09-2002
			MX PA01004828 A	18-09-2002
			NZ 511568 A	29-08-2003
			PL 347630 A1	22-04-2002
			WO 0027359 A1	18-05-2000
			ZA 200103645 A	05-08-2002
WO 03013245	A	20-02-2003	WO 03013245 A1	20-02-2003
			US 2003118539 A1	26-06-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K9/127

Nach der Internationalen Patenklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Rechercherie aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/24773 A (GREGORIADIS GREGORY ; LIPOXEN LTD (GB); PERRIE YVONNE (GB)) 12. April 2001 (2001-04-12) Beispiele 2,3	1,18
X	WO 01/85142 A (ZHU MING ; RAGHAVACHARI NALIMI (US); KINK JOHN (US); FAHL WILLIAM E (U) 15. November 2001 (2001-11-15) Seite 28 - Seite 31; Anspruch 19	1,7, 9-16,18
X	WO 00/27359 A (PILKIEWICZ FRANK G) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Seite 8	1
X	WO 03/013245 A (KINK JOHN A ; FAHL WILLIAM E (US); WISCONSIN ALUMNI RES FOUND (US)) 20. Februar 2003 (2003-02-20) Beispiel 4	1,7,18
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ESTANOL, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000998

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
A	<p>ZI CHEN LI ET AL: "SYNTHESIS OF CHOLESTEROL DERIVATIVES WITH AMINO ACID AS HYDROPHILIC GROUP AND THE VESICLES PREPARED THEREFROM" CHINESE CHEMICAL LETTERS, XX, XX, Bd. 12, Nr. 10, 1999, Seiten 1007-1010, XP008005314 ISSN: 1001-8417 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000998

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Regel 39.1(1v) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000998

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0124773	A	12-04-2001	AU 7540500 A	10-05-2001
			CA 2386024 A1	12-04-2001
			CN 1376056 T	23-10-2002
			EP 1217989 A1	03-07-2002
			WO 0124773 A1	12-04-2001
			JP 2003529550 T	07-10-2003
WO 0185142	A	15-11-2001	AU 5948401 A	20-11-2001
			CA 2408152 A1	15-11-2001
			EP 1280556 A1	05-02-2003
			JP 2004515453 T	27-05-2004
			WO 0185142 A1	15-11-2001
WO 0027359	A	18-05-2000	AU 766703 B2	23-10-2003
			AU 1621200 A	29-05-2000
			CA 2351063 A1	18-05-2000
			CN 1332626 T	23-01-2002
			CZ 20011581 A3	12-12-2001
			EP 1128813 A1	05-09-2001
			HU 0104255 A2	28-03-2002
			JP 2002529393 T	10-09-2002
			MX PA01004828 A	18-09-2002
			NZ 511568 A	29-08-2003
			PL 347630 A1	22-04-2002
			WO 0027359 A1	18-05-2000
			ZA 200103645 A	05-08-2002
WO 03013245	A	20-02-2003	WO 03013245 A1	20-02-2003
			US 2003118539 A1	26-06-2003